

## **M-CSF И GM-CSF ДЕТЕРМИНИРУЮТ ФИБРОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛЯРИЗОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА**

**Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А.,  
Останин А.А., Черных Е.Р.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия*

**Резюме.** Колонистимулирующие факторы, GM-CSF и M-CSF, вызывают различные фенотипические изменения в популяциях линии макрофагов, способствуя дифференцировке клеток в M1- и M2-подобные макрофаги соответственно. Про- и противовоспалительные свойства макрофагов, генерируемых под влиянием данных колонистимулирующих факторов, хорошо описаны в литературе, однако вклад дифференцировочных и поляризующих сигналов в фибромодулирующую активность макрофагов остается неизученным. Для выяснения различий в регуляторных механизмах, контролирующих фиброгенез, которые присущи различно активированным макрофагам, нами было проведено исследование влияния кондиционных сред макрофагов на пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы. В работе были исследованы макрофаги человека, генерированные из моноцитов периферической крови, которые дифференцировали M-CSF или GM-CSF и далее поляризовали в M1-направлении липополисахаридом и в M2-направлении IL-4 или дексаметазоном. Пролиферативный ответ фибробластов определяли радиометрически по включению [3H]-тимидина. Дифференцировку в миофибробласты определяли по экспрессии специфического маркера  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA) с помощью проточной цитометрии. Уровень продукции TGF- $\beta$ 1 макрофагами оценивали с помощью соответствующего ELISA kit. Полученные результаты свидетельствуют о том, что макрофаги, дифференцированные под влиянием «гомеостатического» M-CSF, характеризуются умеренным стимулирующим влиянием на пролиферацию фибробластов, причем эффекты M2 (IL-4) и M2 (Dex) макрофагов превышают эффекты M1 (LPS), при этом не различаются значимо между собой. M-CSF-индуцированные M1 (LPS) и M2 (IL-4) макрофаги, но не M2 (Dex), также усиливают дифференцировку фибробластов, демонстрируя схожий уровень стимуляции. В отличие от M-CSF, макрофаги, индуцированные «провоспалительным» GM-CSF, оказывают выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию фибробластов, причем эффекты M2-макрофагов превышают таковые M1-клеток и наиболее ярко выражены у M2 (Dex). В то же время способность усиливать дифференцировку фибробластов проявляют только GM-CSF-индуцированные макрофаги с M2 (IL-4) фенотипом. Поляризованные дексаметазоном макрофаги – вне зависимости от используемого CSF (M-CSF или GM-CSF) – не влияют значимо на дифференцировку фибробластов. Содержание TGF- $\beta$ 1 в суперна-

### **Адрес для переписки:**

Максимова Александра Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 222-26-74.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

### **Address for correspondence:**

Maksimova Aleksandra A.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 222-26-74.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

### **Образец цитирования:**

А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно,  
М.А. Тихонова, А.А. Останин, Е.Р. Черных «M-CSF  
и GM-CSF детерминируют фибромодулирующую  
активность поляризованных макрофагов человека» //  
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 931-942.  
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2525  
© Максимова А.А. и соавт., 2022

### **For citation:**

A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno,  
M.A. Tikhonova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh “M-CSF  
and GM-CSF determinate fibromodulatory activity of  
polarized human macrophages”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5,  
pp. 931-942. doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2525  
DOI: 10.15789/1563-0625-MCA-2525

тантах различно активированных макрофагов не коррелирует с уровнем стимулирующего влияния кондиционных сред макрофагов на дифференцировку фибробластов. В целом, полученные данные свидетельствуют о вовлечении дифференцировочных и поляризирующих сигналов в модуляцию про- и антифиброгенных свойств макрофагов.

*Ключевые слова:* макрофаги, колониестимулирующие факторы, поляризирующие стимулы, кондиционная среда, фибробласты, фиброз

## M-CSF AND GM-CSF DETERMINATE FIBROMODULATORY ACTIVITY OF POLARIZED HUMAN MACROPHAGES

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** GM-CSF and M-CSF, the hematopoietic colony-stimulating factors, induce various phenotypic changes in macrophage lineage populations and promote cell differentiation, respectively, into M1- and M2-like macrophages. The pro- and anti-inflammatory properties of macrophages generated by these colony-stimulating factors are well described, but the contribution of differentiation and polarization signals to the fibromodulatory activity of macrophages remains unexplored. To clarify the differences in the fibrogenesis regulation mechanisms inherent in differently activated macrophages, we studied the effects of macrophage-conditioned media on proliferation and differentiation of dermal fibroblasts. In this study, the human macrophages generated from peripheral blood monocytes were investigated. They were induced for differentiation by M-CSF or GM-CSF, being further polarized in the M1 direction with lipopolysaccharide and, in the M2 direction, with IL-4 or dexamethasone. Proliferative response of the fibroblasts was determined radiometrically by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. Differentiation into myofibroblasts was determined with flow cytometry technique, as expression of a specific marker  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). The level of macrophage TGF- $\beta$ 1 production was assessed using an appropriate ELISA kit. The data obtained indicate that the macrophages differentiated under the influence of “homeostatic” M-CSF are characterized by a moderate stimulating effect upon fibroblast proliferation, and the effects of M2(IL-4) and M2(Dex) macrophages exceed that of M1(LPS), but do not differ significantly from each other. The M-CSF-induced M1(LPS) and M2(IL-4) macrophages, but not M2(Dex), enhance the fibroblast differentiation and show similar level of stimulation. In contrast to M-CSF, the macrophages induced by “pro-inflammatory” GM-CSF exhibit a pronounced stimulatory effect on fibroblast proliferation, and the effects of M2 macrophages exceed those of M1 cells, being most pronounced for M2(Dex). At the same time, only GM-CSF-induced M2(IL-4) macrophages enhance fibroblast differentiation. Dexamethasone-polarized macrophages do not significantly affect fibroblast differentiation regardless of the CSF used (M-CSF or GM-CSF). The content of TGF- $\beta$ 1 in the supernatants of differently activated macrophages does not correlate with the level of stimulating effect of macrophage-conditioned media upon fibroblast differentiation. In general, the data obtained suggest the involvement of differentiation and polarization signals into modulation of pro- and anti-fibrogenic properties of macrophages.

*Keywords:* macrophages, colony-stimulating factors, polarizing stimuli, conditioned media, fibroblasts, fibrosis

Работа выполнена в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-315-90001, а также за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфо-

идных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета» (№ госрегистрации 122011800324-4).

### Введение

Колониестимулирующие факторы (CSF) играют ключевую роль в функционировании клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Впервые описанные как факторы гемопоэза, M-CSF и GM-CSF регулируют функциональную актив-

ность макрофагов как в гомеостатических, так и в воспалительных условиях [27]. При этом М-CSF в большей степени проявляет черты гомеостатического цитокина, который в steady-state условиях конститутивно продуцируется различными типами клеток (эндотелиальными клетками, фибробластами, моноцитами, макрофагами) и регулирует функционирование большинства тканевых макрофагов (Мф) [18, 27]. Роль GM-CSF в steady-state миелопоэзе не так велика, поскольку этот фактор практически не обнаруживается в системном кровотоке [11], а у GM-CSF-дефицитных мышей не наблюдается серьезных нарушений в миелоидной системе [4, 10, 11, 17]. В то же время продукция GM-CSF резко возрастает при воспалении [21], причем GM-CSF, в отличие от M-CSF, может продуцироваться не только эндотелиальными клетками, фибробластами, Мф, но также и Т- и В-лимфоцитами [19, 30].

M-CSF и GM-CSF по-разному модулируют фенотип Мф, способствуя формированию, соответственно, противовоспалительного (про-M2) и провоспалительного (про-M1) фенотипа [7]. Однако ни один из факторов не является достаточным для индукции дефинитивной поляризации по сравнению с поляризующими стимулами (IFN $\gamma$ , TLRs, IL-4, IL-10 и др.), и как про-M1-, так и про-M2-клетки способны далее поляризоваться в M1- и M2-направлении [12, 25]. Тем не менее тип дифференцировочного фактора, по видимому, предопределяет функциональные особенности поляризованных Мф [3, 15, 29]. Иными словами, гетерогенность Мф детерминируется не только активизирующими сигналами, но и дифференцировочными факторами.

Известно, что Мф являются основными клетками-регуляторами фиброгенеза благодаря своей способности контролировать воспалительную реакцию, участвовать в удалении клеточного детрита и модулировать функциональную активность фибробластов [31]. При этом в зависимости от фазы заживления Мф могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на активность фибробластов, включая хоуминг, пролиферацию, дифференцировку и коллагенсекреторную активность. Координированная регуляция функций фибробластов макрофагами определяет успешное восстановление ткани/органа, тогда как нарушение этих взаимодействий или хроническое повреждение приводит к недостаточному восстановлению тканей (незаживающие раны) или чрезмерному фиброгенезу, переходящему в патологическое рубцевание и фиброз органов [14, 32]. При этом в основе контроля репаративных и фибротических процессов лежит способность данных клеток влиять на функци-

ональную активность фибробластов и процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса.

Большинство данных о про- и антифиброгенных свойствах Мф получено *in vivo* на мышинных моделях, поэтому эффекты Мф могут быть опосредованы не только прямым влиянием на функции фибробластов, но и через множество паракринных механизмов [1]. Кроме того, Мф мышинного и человеческого происхождения существенно различаются по функциональным маркерам, сигнальным путям активации, спектру продуцируемых факторов [20, 23, 26]. Поэтому данные, полученные на мышинных моделях, нельзя экстраполировать на человека. Имеющиеся на сегодняшний день исследования Мф человека немногочисленны и преимущественно ограничены двумя оппозиционными подтипами – классически и альтернативно активированными Мф (M1 и M2a) [9, 16]. Кроме того, в подавляющем большинстве работ для генерации M1- и M2-Мф используют различные дифференцировочные факторы – GM-CSF для индукции M1-фенотипа и M-CSF – для M2, что позволяет изучить свойства Мф с оппозиционными фенотипами, но не позволяет оценить вклад дифференцировочных и поляризующих сигналов. Таким образом, вопрос о том, насколько детерминанты фенотипа Мф предопределяют характер фибромодулирующей активности, остается открытым.

Исследование Мф человека, формирующихся под влиянием различных дифференцировочных (M-CSF/GM-CSF) факторов, в контексте их фибромодулирующих свойств ранее не проводилось. Между тем участие активированных Мф как в накоплении внеклеточного матрикса, так и в разрешении фиброза делает эти клетки перспективными мишенями для лечения заболеваний, связанных с дисрегуляцией фиброгенеза, и требует идентификации фенотипов Мф с про- и антифиброгенными эффектами. Учитывая вышесказанное, **целью настоящего исследования** явился сравнительный анализ влияния M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф, поляризованных липополисахаридом (LPS), IL-4 или дексаметазоном (Dex), на пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы.

## Материалы и методы

В исследование были включены условно здоровые доноры обоего пола 21-64 лет. Забор крови и дальнейшие исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) и далее культивировали в количестве  $4-5 \times 10^6$ /мл в 12-луночных

планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 («БиолоТ», Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамин, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF или GM-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. На 5-й день в культуры добавляли соответствующие поляризующие стимулы: 10 мкг/мл LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, США), 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США), 50 нг/мл Dex (KRKA, Словения). По окончании срока культивирования (7 дней) Мф получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). Супернатанты собирали, центрифугировали, подвергали стерилизующей фильтрации, криоконсервировали и хранили при температуре -80 °С.

Для определения фенотипа Мф окрашивали CD14-FITC, HLA-DR-PE, CD86-FITC, и CD163-PerCP. Относительное содержание позитивных клеток в культурах Мф оценивали при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton-Dickinson, США). Аллостимуляторную активность определяли по способности Мф стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов. Для этого МНК ( $1 \times 10^5$ /лунку) культивировали в отсутствие (контроль) или присутствии различных типов Мф (в соотношении МНК:Мф 10:1). Пролиферацию Т-клеток оценивали радиометрически на 5-й день по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивации (1 мКю/лунку). Аллостимуляторную активность выражали в виде индекса стимуляции (отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК).

Источником фибробластов служила линия дермальных фибробластов ожогового больного NAF1, которая была любезно предоставлена ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепрофилактического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Пролиферативный ответ клеток линии NAF1 определяли радиометрическим методом. Для этого фибробласты культивировали в 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в концентрации  $5 \times 10^3$  клеток/лунку в кондиционной среде различно активированных Мф или среде DMEM/F12 («БиолоТ», Россия) (спонтанная пролиферация) в течение 24 ч, затем среду удаляли, клетки однократно отмывали и продолжали культивирование в среде DMEM/F12 до 5 суток.

Пролиферацию фибробластов оценивали радиометрически по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивирования (1 мКю/лунку). Индекс стимуляции пролиферации фибробластов рассчитывали как отношение пролиферативного ответа фибробластов, обработанных кондиционными средами различно активированных Мф, к уровню спонтанной пролиферации. Для исследования дифференцировки фибробластов в миофибробласты клетки линии NAF1 культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в кондиционной среде различно активированных Мф в течение 24 ч, затем однократно отмывали 3ФР и продолжали культивировать в бессывороточной среде DMEM/F12 («БиолоТ», Россия) в течение 5 дней. Активацию клеток NAF1 оценивали по уровню внутриклеточной экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA) с помощью проточной цитометрии с использованием APC-конъюгированными  $\alpha$ -SMA-антителами (R&D Systems, США). В качестве позитивного контроля использовали TGF- $\beta$ 1-индуцированный (PeproTECH, США) уровень экспрессии  $\alpha$ -SMA.

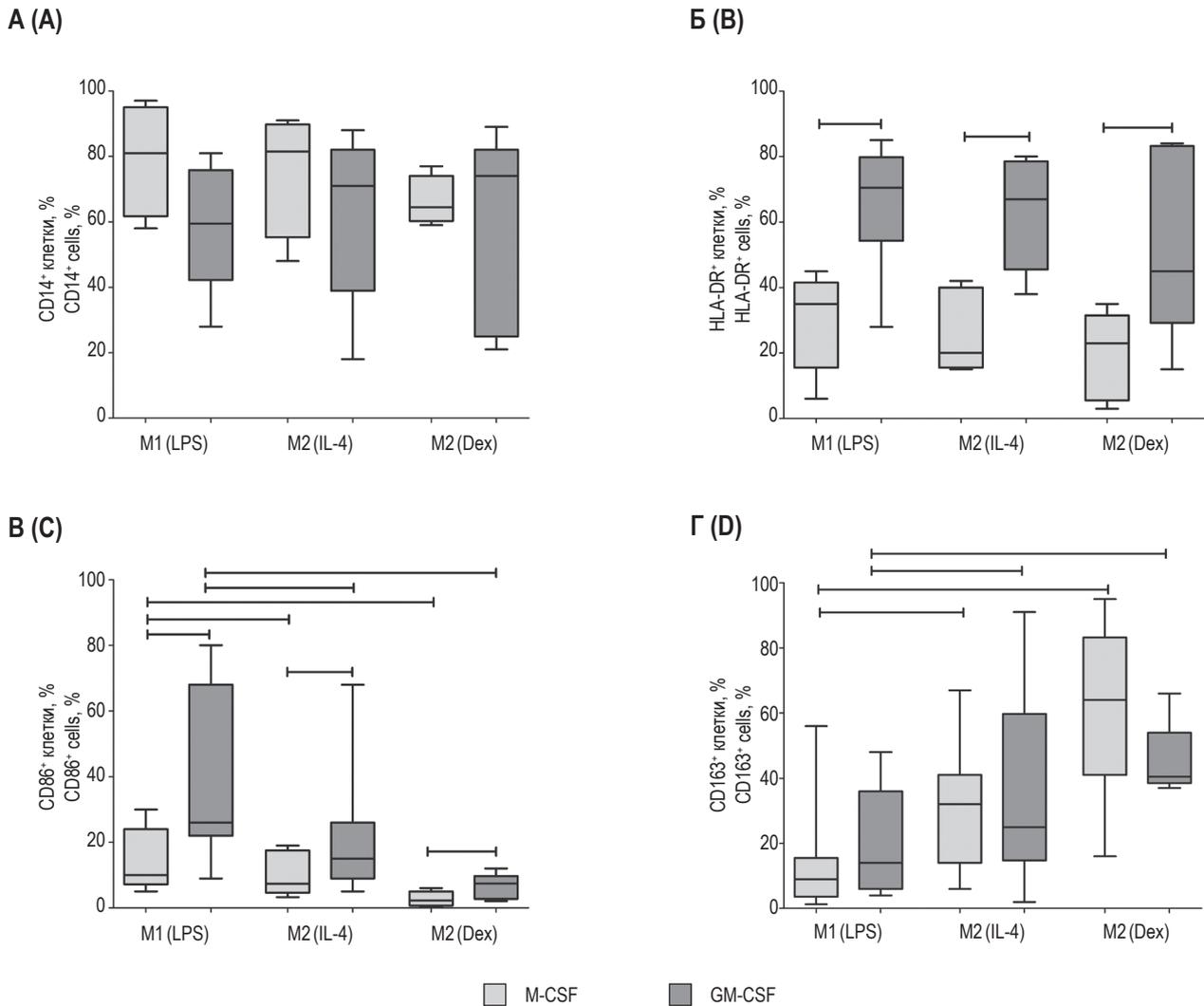
Содержание TGF- $\beta$ 1 в культурах различно активированных Мф исследовали с помощью соответствующего ELISA kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ проводили с использованием возможностей программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ , 25-75% квартили). Значимость различий оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия Манна-Уитни; различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Характеристика макрофагов

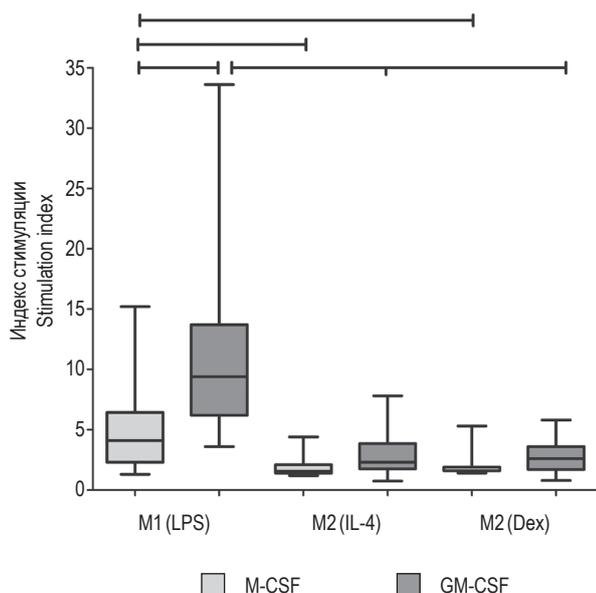
Экспрессия определенных молекул, в том числе ассоциированных с M1- или M2-фенотипом, широко используется для характеристики Мф. Сравнительный фенотипический анализ M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф (M-Мф и GM-Мф соответственно) представлен на рисунке 1. Независимо от типа поляризующего стимула, культуры M-Мф и GM-Мф содержали значительное количество CD14<sup>+</sup> клеток и не различались по данному параметру (рис. 1А). В то же время поляризованные GM-Мф отличались от M-Мф значимо большим уровнем HLA-DR<sup>+</sup> клеток (рис. 1Б). При этом мы не выявили различий по экспрессии CD14 и HLA-DR между различно поляризованными Мф (M1 (LPS), M2 (IL-4) и M2 (Dex)) в популяциях M-Мф и GM-Мф.



**Рисунок 1. Экспрессия поверхностных маркеров M-CSF- и GM-CSF-дифференцированными макрофагами**  
Примечание. А-Г – данные по экспрессии CD14, HLA-DR, CD86 и CD163 представлены в виде Me ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ) и min-max (n = 5-14).  
Figure 1. Expression of surface markers of M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages  
Note. A-D, data on the expression of CD14, HLA-DR, CD86 and CD163 are presented in Me ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ) and min-max (n = 5-14).

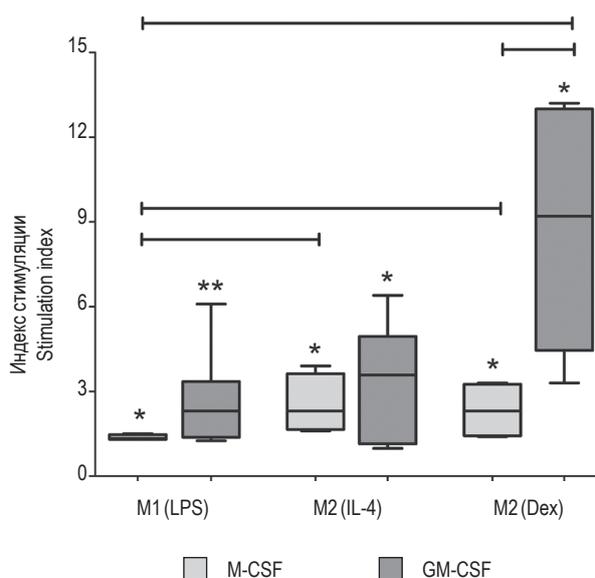
Содержание CD86 (M1-ассоциированный маркер) в культурах М-Мф, независимо от поляризирующего стимула, было в два раза ниже по сравнению с культурами GM-Мф ( $p_U < 0,05$ ). Доля CD163<sup>+</sup> клеток (M2-ассоциированный маркер, рис. 1Г) в культурах М-Мф была минимальной при поляризации LPS и максимальной – при поляризации дексаметазоном. Аналогичные закономерности наблюдались и в культурах поляризованных GM-Мф. При этом содержание CD163<sup>+</sup> клеток в культурах поляризованных М-Мф не отличалось от аналогичных показателей GM-Мф ( $p_U > 0,05$ ).

Ранее нами было показано, что отличительным свойством Мф человека с M2-фенотипом является низкая аллостимуляторная активность (способность индуцировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов), что позволяет различать M1- и M2-фенотипы с высокой чувствительностью и специфичностью [33]. Действительно (рис. 2), Мф, поляризованные LPS (M1), независимо от дифференцировочного фактора, характеризовались значимо более высокими уровнями данного показателя, по сравнению с Мф, поляризованными в M2-направлении (IL-4 и Dex). При этом аллостимуляторная активность GM-Мф с M1-фенотипом



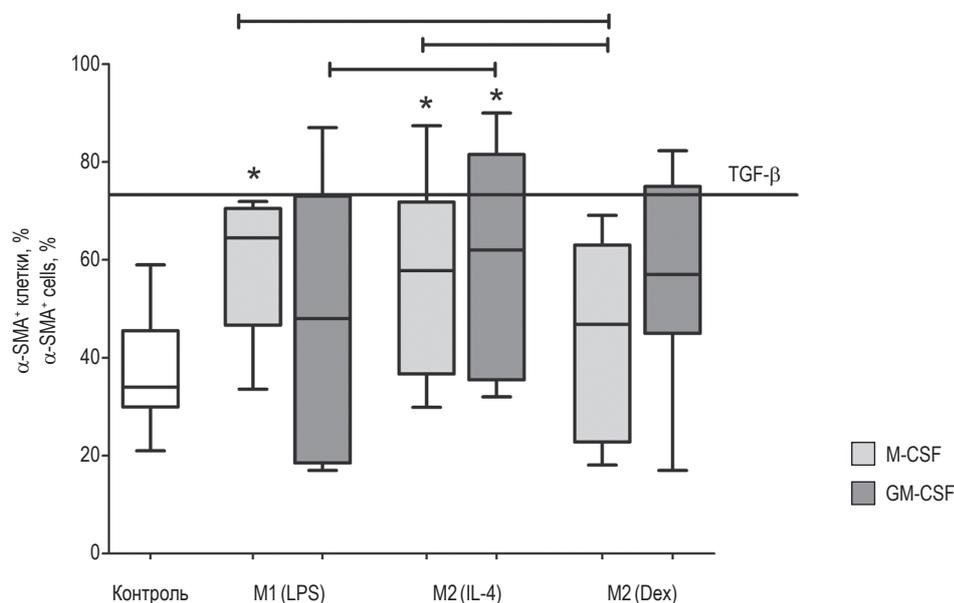
**Рисунок 2. Аллостимуляторная активность M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных макрофагов**  
Примечание. Представлены индексы стимуляции пролиферации клеток линии NAF1 (Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ ), min-max); n = 50.

Figure 2. Allostimulatory activity of M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages  
Note. Stimulatory indices of NAF1 cell proliferation (Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ ), min-max) are presented; n = 50.



**Рисунок 3. Пролиферативный ответ фибробластов, обработанных кондиционной средой различно активированных макрофагов**

Примечание. \* – значимые различия с контролем, n = 8.  
Figure 3. Proliferative response of fibroblasts treated with conditioned media of differently activated macrophages  
Note. \*, significant differences with the control, n = 8.



**Рисунок 4. Относительное содержание  $\alpha$ -SMA-позитивных клеток в культуре фибробластов, обработанных кондиционными средами различно активированных макрофагов**

Примечание. \* – значимые различия с контролем, линией обозначен уровень TGF- $\beta$ 1-индуцированного (позитивного) контроля; n = 10.

Figure 4. Relative content of  $\alpha$ -SMA-positive cells in the culture of fibroblasts treated with conditioned media of differently activated macrophages

Note. \*, significant differences with the control, the line indicates the level of TGF- $\beta$ 1-induced (positive) control; n = 10.

превышала таковую М-Мф ( $p_U = 0,0009$ ). В то же время различий в аллостимуляторной активности между М2-поляризованными (IL-4 и Dex) Мф не наблюдалось.

Таким образом, активированные LPS М-Мф и GM-Мф проявляли признаки клеток с M1-фенотипом, тогда как поляризованные IL-4 и Dex Мф характеризовались признаками M2-фенотипа.

#### Влияние кондиционных сред макрофагов на пролиферацию фибробластов

Поскольку в основе регуляции фиброгенеза макрофагами лежит способность этих клеток регулировать активность фибробластов, основным разделом исследования явилось изучение эффектов Мф на пролиферацию и дифференцировку фибробластов. Анализ влияния кондиционных сред Мф на пролиферативный ответ дермальных фибробластов линии NAF1 показал (рис. 3), что кондиционные среды как М-Мф, так и GM-Мф усиливали пролиферативную активность клеток NAF1. Индекс стимуляции М-Мф варьировал в диапазоне от 1,33 (M1) до 2,3 (M2), причем стимулирующий эффект M2 (IL-4) и M2 (Dex) превышал таковой M1 (LPS) ( $p_w < 0,05$ ). Среди GM-Мф наиболее выраженный стимулирующий эффект проявляли Dex-поляризованные GM-Мф. Индекс стимуляции этих клеток составлял 9,2 и значимо превышал показатели M-CSF-дифференцированных M1 (LPS) и M2 (Dex).

Полученные данные свидетельствуют о том, что способностью к стимуляции пролиферативного ответа дермальных фибробластов обладают как М-Мф, так и GM-Мф, независимо от поляризующего стимула, с максимальным эффектом для GM-Мф, поляризованных дексаметазоном.

#### Влияние кондиционных сред макрофагов на дифференцировку фибробластов

Важным этапом фиброгенеза является активация фибробластов и приобретение ими миофибробластного фенотипа, что отражает увеличение экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина,  $\alpha$ -SMA. Оценка способности клеток линии дермальных фибробластов NAF1 к спонтанной дифферен-

цировке выявила высокое содержание  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> клеток ( $Me = 59\%$ , IQR 50-83%) в культуре, что было расценено нами и подтверждено другими авторами [2] как результат влияния ростовых факторов сыворотки (в частности TGF- $\beta$ ). Для исключения влияния сывороточных факторов в дальнейших экспериментах была использована бессывороточная среда DMEM/F12, что позволило существенно снизить уровень спонтанной дифференцировки клеток NAF1 до 34%  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> фибробластов (негативный контроль). В качестве позитивного контроля использовали TGF- $\beta$ 1-индуцированный уровень экспрессии  $\alpha$ -SMA (72,5%).

Анализ влияния кондиционных сред, полученных от М-Мф, на экспрессию  $\alpha$ -SMA показал, что как M1 (LPS) и M2 (IL-4) стимулировали дифференцировку фибробластов с одинаковым эффектом. Так, содержание  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> клеток в присутствии указанных кондиционных сред возросло в 1,8 и 1,7 раза соответственно ( $p_w < 0,05$  по сравнению с негативным контролем). В то же время среди исследуемых популяций GM-Мф стимулирующий эффект был выявлен только для M2 (IL-4), тогда как M1 (LPS) и M2 (Dex) не влияли значимо на количество  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> клеток в культурах NAF1.

Таким образом, колониестимулирующий фактор (M-CSF или GM-CSF) оказывал влияние на способность Мф с M1-фенотипом индуцировать дифференцировку дермальных фибробластов *in vitro*. Напротив, эффекты Мф с M2-фенотипом на дифференцировку фибробластов не зависели от CSF и определялись преимущественно поляризующим стимулом, поскольку только поляризованные IL-4, но не дексаметазоном, Мф индуцировали экспрессию  $\alpha$ -SMA.

#### Содержание TGF- $\beta$ 1 в кондиционных средах макрофагов

Поскольку одним из ключевых факторов дифференцировки фибробластов является TGF- $\beta$ 1, анализ содержания данного ростового фактора в культурах Мф в сопоставлении с данными по экспрессии  $\alpha$ -SMA на фибробластах представ-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TGF- $\beta$ 1 (пг/мл) В КОНДИЦИОННЫХ СРЕДАХ 7-ДНЕВНЫХ КУЛЬТУР МАКРОФАГОВ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 1. CONTENT OF TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) IN CONDITIONED MEDIA OF 7-DAY MACROPHAGE CULTURES, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

	M-CSF	GM-CSF
M1 (LPS)	2150 (645-4400)	4700 (3350-6000)
M2 (IL-4)	4680 (960-5250)	4850 (4200-7250)
M2 (Dex)	4550 (620-5400)	4100 (1850-5950)*

Примечание. n = 5-8. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с GM-CSF-дифференцированными M2 (IL-4).

Note. n = 5-8. \*,  $p < 0.05$  compared with GM-CSF-differentiated M2 (IL-4).

лялся логичным. Из данных таблицы 1 видно, что и М-Мф, и GM-Мф активно продуцировали TGF- $\beta$ 1, не различаясь значимо, вопреки ожиданиям, между собой по уровню продукции фактора. В то же время среди М-Мф, LPS-поляризованные М1-клетки демонстрировали наиболее низкий уровень продукции TGF- $\beta$ 1 по сравнению с М2(IL-4) (на уровне тренда,  $p_w = 0,07$ ). При этом М2(Dex) не отличались ни от М1(LPS), ни от М2(IL-4) по содержанию TGF- $\beta$ 1. Среди GM-Мф М1(LPS) и М2(IL-4) не различались по уровню продукции TGF- $\beta$ 1, в то время как М2(Dex) характеризовались минимальной TGF- $\beta$ 1-продуцирующей активностью и значимо отличались от М2(IL-4) ( $p_w = 0,017$ ).

## Обсуждение

Полученные данные в целом свидетельствуют о том, что способностью к стимуляции пролиферации дермальных фибробластов обладают как М-Мф, так и GM-Мф, независимо от поляризующего стимула. При этом М-Мф характеризуются умеренным стимулирующим эффектом, и макрофаги с М2-фенотипом (поляризованные IL-4 и Dex) обладают более выраженной стимулирующей активностью, чем М1. В отличие от М-Мф, дифференцированные в присутствии GM-CSF макрофаги более эффективно стимулируют пролиферацию фибробластов с наибольшей стимулирующей активностью у М2(Dex). Дифференцировку фибробластов стимулируют на сопоставимом уровне М-CSF-индуцированные М1(LPS) и М2(IL-4), в то время как среди GM-Мф такой способностью обладают только М2(IL-4). Поляризованные дексаметазоном Мф, вне зависимости от используемого CSF (М-CSF или GM-CSF), не индуцируют дифференцировку фибробластов.

В доступной литературе нам не удалось найти сравнимого по объему исследования, что существенно затрудняет обсуждение представленных данных. В большом количестве исследований для получения М1-фенотипа используется GM-CSF, а для М2 – М-CSF [8, 28, 34]. Позднее было показано, что Мф любого функционального фенотипа (и М1, и М2) могут быть получены как из GM-CSF-, так и М-CSF-дифференцированных Мф [12, 25], однако подобные исследования представлены единичными работами. При этом вопросы взаимодействия Мф и фибробластов и, в частности, фибромодулирующих свойств Мф с различными фенотипами, остаются практически неизученными.

Ploeger и соавт. показали, что М-CSF-дифференцированные Мф, активированные IFN $\gamma$ /LPS, отличаются от М2(IL-4/IL-13) менее выраженным стимулирующим эффектом на про-

лиферацию дермальных фибробластов [16]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, несмотря на использование авторами комбинации поляризующих сигналов (IFN $\gamma$ /LPS и IL-4/IL-13), а не моностимулов (LPS и IL-4). Авторы отметили также усиление экспрессии мРНК  $\alpha$ -SMA в фибробластах, обработанных кондиционными средами М2(IL-4/IL-13), но не М1(IFN $\gamma$ /LPS). Однако на уровне экспрессии белка данные различия не были обнаружены. Эти результаты в целом согласуются с полученными нами данными, демонстрирующими, что М-Мф, активированные LPS, характеризуются значимо меньшим стимулирующим эффектом на пролиферацию фибробластов по сравнению с М2(IL-4), однако не различаются по влиянию на уровень экспрессии  $\alpha$ -SMA.

В другом исследовании Glim и соавт. изучали влияние спонтанно дифференцированных Мф (без использования CSF) и поляризованных IFN $\gamma$ /LPS (М1) или IL-4 (М2), на дифференцировку фибробластов. Согласно полученным ими данным, кондиционные среды М2-Мф повышали экспрессию  $\alpha$ -SMA, тогда как М1 характеризовались тенденцией к подавлению дифференцировки фибробластов [9], что расходится с результатами наших исследований. Причинами таких расхождений могут быть различия в протоколах генерации Мф, в частности дифференцировка макрофагов в отсутствие колониестимулирующих факторов. Более того, неоднозначность данных по влиянию М1-Мф на дифференцировку фибробластов может указывать на важное значение CSF как дифференцировочных стимулов в реализации фиброгенной активности Мф.

Следует отметить, что для поляризации М2-макрофагов авторы использовали IL-4, в то время как другие типы М2-Мф, в частности поляризованные дексаметазоном, оставались неисследованными. Между тем, высвобождение кортикостероидов является важным эндогенным фактором, определяющими переход от воспалительной к пролиферативной и ремоделирующей фазам репаративного ответа. В присутствии дексаметазона Мф приобретают противовоспалительный М2-подобный фенотип (М2с), который, как предполагается, проявляет антифиброгенную активность [1], что было подтверждено у экспериментальных животных [6, 24]. С другой стороны, у человека спонтанно индуцированные Мф, поляризованные IL-4 и Dex, не различаются по фибромодулирующей активности [22]. Согласно нашим данным, М-CSF-дифференцированные М2(IL-4) и М2(Dex) действительно не различались по влиянию на пролиферативный ответ фибробластов, однако стимулирующий эффект GM-CSF-дифференцированных М2(Dex) более

чем в два раза превышал эффекты других функциональных фенотипов. Примечательно, что вне зависимости от используемого CSF, M2 (Dex) не влияли на содержание  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> клеток в отличие от M2 (IL-4). Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что поляризованные дексаметазоном Мф человека отличаются от M2 (IL-4) по своим фибромодулирующим свойствам, что противоречит данным Song и соавт. и, вероятнее всего, связано с отсутствием CSF в протоколе генерации Мф в этой работе [22].

Известно, что TGF- $\beta$ 1 является важным фактором дифференцировки фибробластов [5, 13], поэтому высокий уровень его продукции в культурах M2 (IL-4) может объяснить выраженное стимулирующее влияние Мф этого фенотипа на дифференцировку NAF1. Тем не менее TGF- $\beta$ 1, по-видимому, является не единственным фактором, опосредующим влияние Мф на экспрессию  $\alpha$ -SMA фибробластами. Так, M-CSF-дифференцированные M1 (LPS) продуцировали меньшие концентрации TGF- $\beta$ 1 по сравнению с M2 (IL-4), но обладали сопоставимым стимулирующим эффектом на дифференцировку фибробластов. С другой стороны, GM-CSF-дифференцированные M1 (LPS) и M2 (IL-4), несмотря на одинаковый уровень продукции TGF- $\beta$ 1, оказывали различное влияние на дифференцировку фибробластов. Наконец, мы не выявили связи между концентрацией TGF- $\beta$ 1 и уровнем экспрессии  $\alpha$ -SMA в отношении

M2 (Dex). Полученные результаты вполне согласуются с работой Glim и соавт., продемонстрировавших, что спонтанно дифференцированные M1 (IFN $\gamma$ /LPS) и M2 (IL-4) стимулируют экспрессию  $\alpha$ -SMA преимущественно через TGF- $\beta$ -независимые механизмы [9].

Непосредственное сравнение фибромодулирующих свойств M-Мф и GM-Мф показывает, что одно из наиболее принципиальных различий касается Мф с M1-фенотипом. В частности, GM-CSF-стимулированные M1 (LPS) значительно превышают M-CSF-индуцированные M1-клетки по способности усиливать пролиферацию фибробластов, в то же время уступая по стимулирующему влиянию на дифференцировку последних. Другое различие касается M2 (Dex). Действительно, по сравнению с M-CSF, GM-CSF многократно усиливает способность поляризованных дексаметазоном Мф стимулировать пролиферацию дермальных фибробластов.

## Заключение

Таким образом, дифференцировочные факторы, наряду с поляризующими стимулами, вносят существенный вклад в фибромодулирующую активность фибробластов, что следует учитывать при разработке клеточных платформ для лечения заболеваний, связанных с дисрегуляцией фиброгенеза.

## Список литературы / References

1. Adhyatmika A., Putri K.S., Beljaars L., Melgert B.N. The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med. (Lausanne)*, 2015, Vol. 2, 81. doi: 10.3389/fmed.2015.00081.
2. Baranyi U., Winter B., Gugerell A., Hegedus B., Brostjan C., Laufer G., Messner B. Primary human fibroblasts in culture switch to a myofibroblast-like phenotype independently of TGF Beta. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 7, 721. doi: 10.3390/cells8070721.
3. Beyer M., Mallmann M.R., Xue J., Staratschek-Jox A., Vorholt D., Krebs W., Sommer D., Sander J., Mertens C., Nino-Castro A., Schmidt S.V., Schultze J.L. High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45466. doi: 10.1371/journal.pone.0045466.
4. Bogunovic M., Ginhoux F., Helft J., Shang L., Hashimoto D., Greter M., Liu K., Jakubzick C., Ingersoll M.A., Leboeuf M., Stanley R., Nussenzweig M., Lira S.A., Randolph G.J., Merad M. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 513-525.
5. Borthwick L.A., Wynn T.A., Fisher A.J. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1832, no. 7, pp. 1049-1060.
6. Duan J., Liu, X., Wang, H., Guo, S. W. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, Vol. 37, no. 3, pp. 254-268.
7. Fleetwood A.J., Dinh H., Cook A.D., Hertzog P.J., Hamilton J.A. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 86, no. 2, pp. 411-421.
8. Gindele J.A., Mang S., Pairet N., Christ I., Gantner F. Schymeinsky J., Lamb D.J. Opposing effects of *in vitro* differentiated macrophages sub-type on epithelial wound healing. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0184386. doi: 10.1371/journal.pone.0184386.

9. Glim J.E., Niessen F.B., Everts V., van Egmond M., Beelen R.H. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 6, pp. 924-929.
10. Hamilton J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, no. 8, pp. 533-544.
11. Hamilton J.A., Anderson G.P. GM-CSF Biology. *Growth Factors*, 2004, Vol. 22, no. 4, pp. 225-231.
12. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 281, no. 1, pp. 51-61.
13. Luzina I.G., Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
14. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf.)*, 2017, Vol. 4, no. 2, pp. 39-53.
15. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1 (LPS+) vs. Classically and M2 (LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.*, 2019, no. 10, 1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.
16. Ploeger D.T., Hoesper N.A., Schipper M., Koerts J.A., de Rond S., Bank R.A. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun. Signal.*, 2013, Vol. 11, no. 1, 29. doi: 10.1186/1478-811X-11-29.
17. Shi Y., Liu C.H., Roberts A.I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z.R., Tan H.S., Das G., Devadas S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.*, 2006, Vol. 16, no. 2, pp. 126-133.
18. Shibata Y., Berclaz P.Y., Chroneos Z.C., Yoshida M., Whitsett J.A., Trapnell B.C. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, 2001, Vol. 15, no. 4, pp. 557-567.
19. Shiomi A., Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 568543. doi: 10.1155/2015/568543.
20. Shiratori H., Feinweber C., Luckhardt S., Linke B., Resch E., Geisslinger G., Weigert A., Parnham M.J. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize *in vitro*. *Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 88, pp. 58-68.
21. Sierra-Filardi E., Nieto C., Domínguez-Soto A., Barroso R., Sánchez-Mateos P., Puig-Kroger A., López-Bravo M., Joven J., Ardavín C., Rodríguez-Fernández J.L., Sánchez-Torres C., Mellado M., Corbí A.L. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 8, pp. 3858-3867.
22. Song E., Ouyang N., Hörbelt M., Antus B., Wang M., Exton M.S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.*, 2000, Vol. 204, no. 1, pp. 19-28.
23. Spiller K.L., Wrona E.A., Romero-Torres S., Pallotta I., Graney P.L., Witherel C.E., Panicker L.M., Feldman R.A., Urbanska A.M., Santambrogio L., Vunjak-Novakovic G., Freytes D.O. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Exp. Cell Res.*, 2016, Vol. 347, no. 1, pp. 1-13.
24. Tang L., Zhang H., Wang C., Li H., Zhang Q., Bai J. M2A and M2C macrophage subsets ameliorate inflammation and fibroproliferation in acute lung injury through interleukin 10 pathway. *Shock*, 2017, Vol. 48, no. 1, pp. 119-129.
25. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.
26. Tedesco S., de Majo F., Kim J., Trenti A., Trevisi L., Fadini G.P., Bolego C., Zandstra P.W., Cignarella A., Vitiello L. Convenience versus biological significance: Are PMA-Differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying *in vitro* polarization? *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 71. doi: 10.3389/fphar.2018.00071.
27. Ushach I., Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 100, no. 3, pp. 481-489.
28. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., van der Zanden L., Ottenhoff T.H. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- $\gamma$ - and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 285-293.
29. Vogel D.Y., Glim J.E., Stavenuiter A.W., Breur M., Heijnen P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H. Human macrophage polarization *in vitro*: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 9, pp. 695-703.

30. Wicks I.P., Roberts A.W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 37-48.
31. Wynn T., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver. Dis.*, 2010, Vol. 30, no. 3, pp. 245-257.
32. Xu X., Gu S., Huang X., Ren J., Gu Y., Wei C., Lian X., Li H., Gao Y., Jin R., Gu B., Zan T., Wang Z. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burns Trauma*, 2020, Vol. 8, tkaa006. doi: 10.1093/burnst/tkaa006.
33. Yankovskaya A.A., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Dome A.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Allostimulatory activity as a criterion of the functional phenotype of human macrophages. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 10, pp. 890-896.
34. Zizzo G., Hilliard B.A., Monestier M., Cohen P.L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 7, pp. 3508-3520.

---

**Авторы:**

**Максимова А.А.** — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Шевела Е.Я.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сахно Л.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Maksimova A.A.**, PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Shevela E.Ya.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sakhno L.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Тихонова М.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Tikhonova M.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 20.05.2022  
Принята к печати 22.05.2022

---

Received 20.05.2022  
Accepted 22.05.2022